

Alteración de los parámetros AgNOR en eritrocitos de *Oreochromis niloticus* expuestos a dicromato de potasio

Altered AgNOR parameters in peripheral blood erythrocytes of *Oreochromis niloticus* exposed to potassium dichromate

Julio Leon; Zulita Prieto*

Laboratorio de Genética, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo.
Av. Juan Pablo II s/n – Ciudad Universitaria, Trujillo, Perú.

*Autor para correspondencia: zprieto@unitru.edu.pe (Z. Prieto).

RESUMEN

Cuantificar la variación de los parámetros de las regiones AgNOR en eritrocitos de sangre periférica de *Oreochromis niloticus* por una exposición prolongada a dicromato de potasio. Se utilizan Individuos de *Oreochromis niloticus* fueron expuestos a dicromato de potasio durante 90 días, se colectaron muestras de sangre de cada pez antes y después de la exposición a los tratamientos. Se cuantificaron área y número de regiones AgNOR por célula y se realizaron las comparaciones estadísticas con una significancia de $p < 0,05$. El área de las regiones AgNOR de los grupos expuestos a dicromato de potasio fueron significativamente mayores al grupo control ($p < 0,05$). El número promedio de las regiones AgNOR no fueron significativamente diferentes al grupo control ($p = 0,099$). Los valores altamente significativos en el área de las regiones AgNOR ($p < 0,05$) en los grupos expuestos a dicromato de potasio indica la alta demanda de síntesis de proteínas que podría estar relacionada con la activación de la división celular en las células de sangre periférica.

Palabras clave: Dicromato de potasio; Cr VI; *Oreochromis niloticus*; regiones AgNOR; genotoxicidad.

ABSTRACT

To carry out a quantification the AgNOR regions parameters in peripheral blood erythrocytes of *Oreochromis niloticus* under treatment with potassium dichromate. Individuals of *Oreochromis niloticus* were exposed to potassium dichromate for 90 days, blood samples of each fish were taken before and after the exposure to the treatments. Area and number of AgNOR regions were quantified per cell and analyzed by statistical comparisons, $p < 0.05$ was considered significant. The groups exposed to potassium dichromate had an area of the AgNOR regions significantly higher than the control group ($p < 0.05$). The average of the AgNOR regions per cell did not show statistically significant difference ($p = 0.099$). The high values of the area of the AgNOR regions found on the groups exposed to potassium dichromate indicates a high demand of protein synthesis that would be related to the activation of the cellular division in cells of peripheral blood.

Keywords: Dichromate of potassium; Cr IV; *Oreochromis niloticus*; AgNOR regions; genotoxicity.

INTRODUCCIÓN

La técnica AgNOR permite la visualización de proteínas altamente afines a la plata (Ag) asociadas a las regiones organizadoras de nucléolos como nucleolin, nucleofosfin, sub unidades de la RNA polimerasa I y el factor de transcripción UBF (Derenzini, 2000). La cuantificación de las regiones AgNOR constituye un parámetro para obtener información en preparados *in situ* de los cambios en la actividad transcripcional del ARNr (Treré *et al.*, 2004).

Las células con una alta actividad proliferativa como las células cancerosas tienen un elevado índice de biogénesis ribosomal el cual es el principal esfuerzo metabólico de una célula en proliferación (Schmidt, 1999). Es por ello que la cuantificación de regiones AgNOR ha mostrado ser una herramienta de gran utilidad en el diagnóstico y pronóstico de neoplasias en numerosos tipos de cáncer así, en tejido endometrial se determinó una clara distinción en cambios benignos, pre-malignos y malignos (Brustmann *et al.*, 1995); los valores de las regiones AgNOR, en carcinomas de la glándula paratiroides fueron significativamente mas altos, que en adenomas e hiperplasia de esta misma glándula (Kanematsu *et al.*, 1997). La cuantificación de regiones AgNOR constituye también un marcador indicador de citotoxicidad. En evaluaciones en peces teleosteos, los parámetros de las regiones AgNOR en células de la aleta caudal, disminuyeron a los 180 min de exposición a un agentes tóxicos como lamda-cialotrin (Cavas y Ergene-Gözükara, 2003a), efluentes textiles (Cavas y Ergene-Gözükara, 2003b) y metales como el cobre y cadmio (Arkhipchuk y Garanko, 2005). Sin embargo, Investigaciones acerca del cambio en la actividad transcripcional del ARNr evaluados mediante la técnica AgNOR en células expuestas durante largos periodos a un genotóxico aún no han sido realizadas.

El cromo hexavalente (Cr VI) es un metal que ocasiona efectos nocivos sobre el material genético de los organismos y los compuestos que forma el Cr VI han sido declarados por la International Agency for Research on Cancer (IARC) (1999) como carcinogénicos potenciales de clase I. El

dicromato de potasio fuente importante de este metal ha mostrado tener efectos genotóxicos en células de mamíferos como leucocitos de ratón *in vivo* y en cultivo de células de linfocitos humanos en sistemas biológicos acuáticos (Davi *et al.*, 2001; Blasiak y Kowalik, 2000.) como: *Cyprinus carpio*, *Carassius gibelio* y *Corydoras paleatus* (Cavas *et al.*, 2005), *Procambarus clarkii* (Sienra *et al.*, 2003) y *Oreochromis niloticus* (Prieto *et al.*, 2008).

Debido a la creciente contaminación de los ecosistemas y a la continua exposición humana al Cr VI, estudios de sus efectos sobre las principales biomoléculas y procesos celulares son de gran importancia. Es por ello que en esta investigación se determinaron los efectos de un largo periodo de exposición a dicromato de potasio sobre actividad transcripcional del ARNr mediante la técnica AgNOR en eritrocitos de *Oreochromis niloticus* (Shtiza *et al.*, 2005; Krystek y Ritsema, 2007; Barceloux, 1993; Lees, 1991).

MATERIAL Y MÉTODOS

Sistema biológico

Se seleccionaron individuos de *Oreochromis niloticus* de 10 cm +/- 1cm de longitud y se mantuvieron en peceras de 60 cm x 35 cm x 40 cm con tipo de alimentación, aireación y cambios de agua constantes, durante 3 semanas para su respectiva aclimatación a condiciones de laboratorio.

Diseño experimental

Se dispuso de 12 acuarios de 3 litros en los cuales se distribuyeron los tratamientos: agua potable de clorinada (control), dicromato de potasio 0,4 mg/L y 0,8 mg/L considerando 4 repeticiones por tratamiento. Los peces se colocaron individualmente en cada recipiente y fueron expuestos durante 90 días, con un recambio semanal de las soluciones para evitar la pérdida de concentración de dicromato de potasio.

Preparados citológicos

Se colectaron muestras de sangre del arco branquial de cada pez, al inicio y a los 90 días de tratamiento y se realizaron extendidos celulares, los cuales fueron fijados con etanol absoluto durante 20

min., secados al aire y luego coloreados en oscuridad a 37°C durante 27 min. con una solución de gelatina al 0,33%, ácido fórmico al 1% y nitrato de plata (AgNO_3) al 33,3%.

Cuantificación de regiones AgNOR

Se cuantificaron 200 eritrocitos por lámina en un microscopio a 1000x. Se obtuvo el número promedio de regiones AgNOR por célula y área promedio de regiones AgNOR por célula. Para la determinación del área se hizo un análisis morfométrico por imagen, utilizando el software Visilog 5.2.

Análisis estadísticos

El efecto de los tratamientos sobre los valores de las regiones AgNOR (Nro. y área por célula) se determinó con el análisis de varianza y el contraste múltiple de rango LSD.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las regiones AgNOR, se visualizaron como puntos negros con heterogeneidad de forma, número, ubicación y tamaño. Las regiones AgNOR del grupo control, así como las encontradas antes de la exposición a los tratamientos fueron muy pequeñas y apenas perceptibles al microscopio óptico. (Figura 1 A, B, C y E), a diferencia de las regiones encontradas en los grupos expuestos a dicromato de potasio durante 90 días (Figura 1 D y F).

Se registraron regiones AgNOR en eritrocitos con una serie de anomalías en la morfología nuclear y no se encontró un patrón definido que relacione el número, tamaño y forma de las regiones AgNOR con las anomalías morfonucleares encontradas (Figura 2). El área de las regiones AgNOR por célula, registradas antes de la exposición, estuvieron en un rango de $0,23 \mu\text{m}^2$ y $0,24 \mu\text{m}^2$. Los grupos expuestos a dicromato de potasio fueron significativamente mayores al grupo control registrándose diferencias significativas entre el control y los grupos expuestos a dicromato de potasio durante 90 días (Tabla 1).

Tabla 1. Número (Nro./cel.) y área de regiones AgNOR por célula (Área/cel.) en eritrocitos de *O. niloticus* expuestos a dicromato de potasio ($\text{Cr}_2\text{K}_2\text{O}_7$)

Tratamientos mg/L	Días	Nro./cel. $\bar{X} \pm \text{SD}$	Área/cel. $\bar{X} \pm \text{SD}$
0,0	0	$1,11 \pm 0,037$	$0,24 \pm 0,029$
	90	$1,42 \pm 0,313$	$0,31 \pm 0,036$
0,4	0	$1,11 \pm 0,030$	$0,23 \pm 0,026$
	90	$1,63 \pm 0,055$	$0,42 \pm 0,043^*$
0,8	0	$1,15 \pm 0,067$	$0,24 \pm 0,030$
	90	$1,84 \pm 0,103$	$0,45 \pm 0,058^*$

\bar{X} : promedio, SD: desviación estándar

*: diferencias significativas ($p < 0,05$) comparado con el grupo control (0,0 mg/L)

El número de regiones AgNOR encontrados antes de la exposición los tratamientos estuvieron en un rango de 1,11 y 1,15 por célula. Luego de la exposición a dicromato de potasio, el número de regiones AgNOR por célula en los grupos expuestos fueron mayores que el grupo control pero no fueron significativamente diferentes ($p = 0,099$) (Tabla 1).

En interface, las regiones AgNOR reflejan la actividad transcripcional del ARNr, mecanismo crucial para que se lleve a cabo la biogénesis ribosomal que en relación directa con la demanda de síntesis proteica (Derenzini *et al.*, 2000). Los bajos valores de las regiones AgNOR encontrados antes de la exposición es una característica que concuerda con lo esperado ya que los eritrocitos de *O. niloticus* en sangre periférica, aunque son nucleados, carecen de división celular, teniendo una demanda transcripcional ribosomal baja en función de sus necesidades metabólicas. Se ha demostrado que células con una escasa proliferación celular como en linfocitos, se caracterizan por tener pequeñas y aisladas regiones AgNOR (Derenzini, 2000), lo cual confirma, además, la relación directa entre la biogénesis ribosomal y la actividad proliferativa.

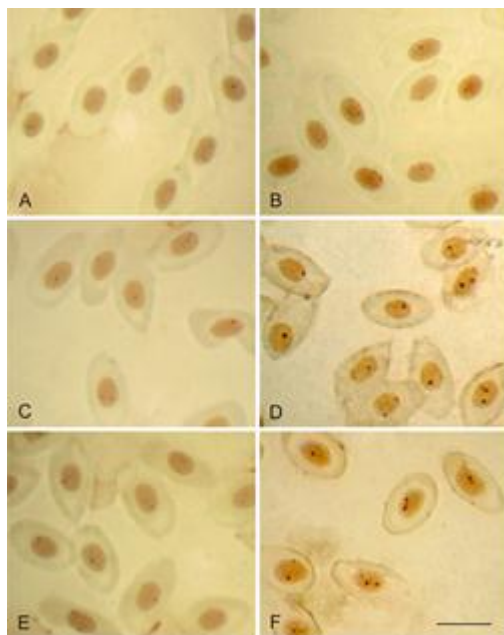


Figura. 1 Regiones AgNOR en eritrocitos de *O. niloticus*: Grupo control: A-0 días y B-90 días. Grupo 0,4 mg/L de $\text{Cr}_2\text{K}_2\text{O}_7$: C-0 días y D-90 días. Grupo 0,8 mg/L de $\text{Cr}_2\text{K}_2\text{O}_7$: E-0 días y F-90 días. Barra 10 μm .

El aumento de los parámetros de las regiones AgNOR y las anomalías morfonucleares encontradas en eritrocitos de sangre periférica de *O. niloticus* confirman el daño sobre el material genético ocasionado por el cromo, este puede darse por dos maneras principales: el daño oxidativo del ADN y la interacción Cr III-ADN pudiendo ocasionar aductos Cr-ADN, uniones ADN-ADN y ADN-proteínas, además de modificaciones nucleotídicas (Levina y Lay, 2004; Kirpnick-Sobol y Reliene, 2006). Estos efectos se habrían producido durante la hematopoyesis en el riñón cefálico, principal órgano responsable de este proceso en peces teleósteos (Udroiu, 2006).

Ante esta constante exposición genotóxica, los genes involucrados en el control del ciclo celular juegan un importante rol en la prevención de una posible transformación neoplásica. En efecto, el aumento de la proteína p53 y su actividad de unión al ADN por el efecto del Cr VI derivado del dicromato de ha sido demostrado *in Vitro* en células epiteliales de pulmón evaluado hasta 16h de exposición, indicando al radical oxidrilo (OH), como el principal causante de la activación del gen p53 (Wang, et al., 2000).

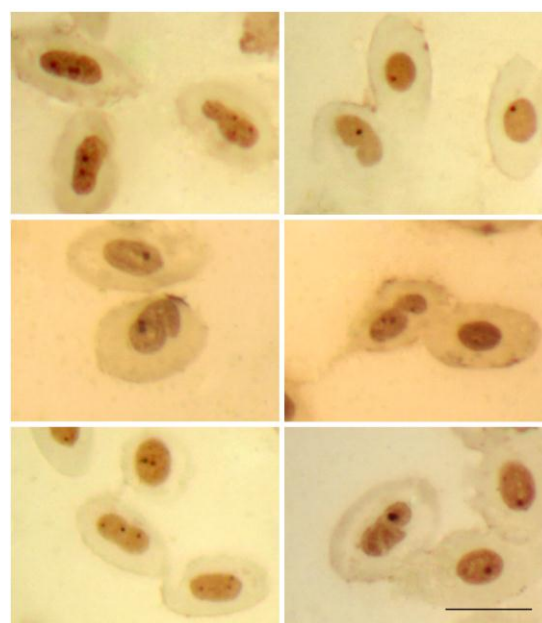


Figura 2. Regiones AgNOR de eritrocitos con anomalías morfonucleares de *O. niloticus* expuestos a $\text{Cr}_2\text{K}_2\text{O}_7$. Barra 10 μm

Sin embargo, por una inestabilidad genética prolongada, la función este tipo de genes podrían alterarse ocasionando la pérdida de los mecanismos que inhiben la progresión del ciclo celular, permitiendo de esta manera que una célula alterada continúe dividiéndose y acumulando mutaciones que podrían derivar en una transformación neoplásica. Al respecto, en estudios epidemiológicos de cáncer pulmonar asociado a la exposición al cromo, se determinó la metilación la región promotora del gen p16 y su reducida expresión, cuyo producto es un inhibidor del complejo Cdk4-Ciclina D que favorece la progresión del ciclo celular (Kondo et al., 2006).

Por otro lado, la relación entre la actividad de los genes supresores de tumores p53 y pRb y la actividad transcripcional del ARNr mediante la cuantificación de las regiones AgNOR, ha sido investigada por Treré (2004) en tumores primarios de cáncer de mama, encontrando que las células tumorales que tuvieron delección del gen pRb, un alto índice de pRb fosforilado y mutaciones del p53 se caracterizaron por tener un índice altamente significativo de los valores en área de las regiones AgNOR respecto a las células que tenían el p53 y pRb inalterados.

Teniendo en cuenta la posible alteración de los genes implicados en el control del

ciclo celular y la relación directa entre la biogénesis ribosomal con la actividad proliferativa, los valores altamente significativos en el área de las regiones AgNOR ($p < 0,05$) en los grupos expuestos durante 90 días a dicromato de potasio indicaría la alta demanda de síntesis de proteínas relacionada con la activación de la división celular en las células de sangre periférica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arkhipchuk, V.V. y Garanko, N.N. 2005. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. *Ecotoxicol Environ Safety*. 62: 42–52 pp.
- Barceloux, D.G. 1993. Chromium. *J Toxicol Clin Toxicol*. 37(2): 173-94 pp.
- Blasiak, J. y Kowalik, J. 2000. A comparison of the in vitro genotoxicity of tri- and hexavalent chromium. *Mutat Res*. 469: 135–145 pp.
- Brustmann, H.; Riss, P.; Naudi, S. 1995. Nucleolar Organizer Regions As Markers of Endometrial Proliferation: A Study of Normal, Hyperplastic, and Neoplastic Tissue *Hum Pathol*. 26: 664-667 pp.
- Cavas, T. y Ergene-Gözükara, S. 2003a. Evaluation of the genotoxic potencial of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells. *Mutat Res*. 534: 93-99 pp.
- Cavas, T. y Ergene-Gözükara, S. 2003b. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutat Res*. 538: 81–91 pp.
- Cavas, T.; Garanko, N.N.; Arkhipchuk, V.V. 2005. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food Chem Toxicol*. 43: 569–574 pp.
- Derenzini, M. 2000. The AgNORs. *Micron*. 31:117-120.
- Derenzini, M.; Treré, D.; Pession, A.; Govoni, M.; Sirri, V.; Chieco, P. 2000. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. *J Pathol*. 191: 181-186 pp.
- Devi, K. D.; Rozati, R.; Banu, B.S.; Jamil, K.; Grover, P. 2001. In vivo genotoxic effect of potassium dichromate in mice leukocytes using comet assay. *Food Chem Toxicol*. 39: 859–865 pp.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1990. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Chromium, nickel and welding. France.
- Kanematsu, E.; Matsui, H.; Deguchi, T.; Yamamoto, O.; Korematsu, M.; Kobayashi, A. 1997. Significance of AgNOR Counts for Distinguishing Carcinoma From Adenoma and Hyperplasia in Parathyroid Gland. *Hum Pathol*. 28: 421-427 pp.
- Kirpnick-Sobol, Z. y Reliene, R. 2006. Schiestl RH. Carcinogenic Cr(VI) and the Nutritional Supplement Cr(III) Induce DNA Deletions in Yeast and Mice. *Cancer Res*. 66: 3480-3484 pp.
- Kondo, K.; Takahashi, Y.; Hirose, Y.; Nagao, T.; Tsuyuguchi, M.; Hashimoto, M. 2006. The reduced expression and aberrant methylation of p16INK4a in chromate workers with lung cancer. *Lung Cancer*. 53: 295-302 pp.
- Krystek, P.; Ritsema, R. 2007. Monitoring of chromium species and 11 selected metals in emission and immission of airborne environment. *Int J Mass Spectrom*. 265(1): 23-29 pp.
- Lees, P.S. 1991. Chromium and disease: review of epidemiologic studies with particular reference to etiologic information provided by measures of exposure. *Environ Health Perspect*. 92: 93-104 pp.
- Levina, A. y Lay, P.A. 2004. Mechanistic studies of relevance to the biological activities of chromium. *Coord Chem Rev*. 249: 281-298 pp.
- Prieto, Z.; León-Incio, J.; Quijano-Jara, C.; Fernández, R.; Polo-Benites, E.; Vallejo-Rodríguez, R. 2008. Efecto genotóxico del dicromato de potasio en eritrocitos de sangre periférica de *Oreochromis niloticus* (tilapia). 25(1):51-58 pp.
- Schmidt, E.V. 1999. The role of c-myc in cellular growth control. *Oncogene*. 1999; 18:2988-2996.
- Shtiza, A.; Swennen, R.; Tashko, A. 2005. Chromium and nickel distribution in soils, active river, overbank sediments and dust around the Burrell chromium smelter (Albania). *J Geochem Explor*. 87(3): 92-108 pp.
- Sienra, E.; Armienta, M.A.; Gonsebatt, M.E. 2003. Potassium dichromate increases the micronucleus frequency in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Environ Pollut*. 126: 367–370 pp.
- Treré, D.; Ceccarelli, C.; Montanaro, L.; Tosti, E.; Derenzini, M. 2004 Nucleolar Size and Activity Are Related to pRb and p53 Status in Human Breast Cancer. *J Histochem Cytochem*. 52: 1601–1607 pp.
- Treré, D.; Ceccarelli, C.; Montanaro, L.; Tosti, E.; Derenzini, M. 2004. Nucleolar Size and Activity Are Related to pRb and p53 Status in Human Breast Cancer. *J Histochem Cytochem*. 52: 1601–1607 pp.
- Udroiu, I. 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicol*. 79: 201-204.
- Wang, S.; Leonard, S.S.; Ye, J.; Ding, M.; Shi, X. 2000. The role of hydroxyl radical as a messenger in Cr (VI)-induced p53 activation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 279: 868-875 pp.